Aus dem Toxikologischen Institut der Universität Tübingen
Direktor: Dr. med. H. Remmer

Das neue Antikonvulsivum Clonazepam aus der Benzodiazepinreihe und seine Wirkung auf die Bildung von cyclischem Adenosin 3', 5' – Monophosphat im Gehirn von Ratten

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Theoretische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Elisabeth Nothelfer, geb. Zottmann
aus München

1977

Aus dem Toxikologischen Institut der Universität Tübingen
Direktor: Dr. med. H. Remmer

Das neue Antikonvulsivum Clonazepam aus der Benzodiazepinreihe und seine Wirkung auf die Bildung von cyclischem Adenosin 3′, 5′ – Monophosphat im Gehirn von Ratten

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Theoretische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Elisabeth Nothelfer, geb. Zottmann
aus München

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan:	Prof. Dr. med. H.J. Mallach
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. rer. nat. J. Schultz
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. H. Remmer
Korreferent:	Doz. Dr. med. H.-J. Ruoff

Meinem lieben Mann

und meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung.....7

II. Methoden 12

1. Vorbehandlung.....12

2. Präparation und Inkubation von Gehirnschnitten.....13

3. Isolierung von cyclo - AMP.....15

4. Gilman - Test.....17

5. Proteinbestimmung.....17

6. Versuche mit unbehandelten Ratten.....18

III. Material.....19

IV. Ergebnisse.....21

V. Diskussion.....39

VI. Zusammenfassung.....48

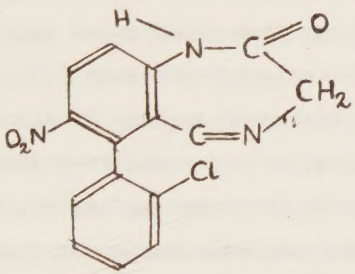
VII. Literaturverzeichnis.....51

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523702_0048

I. Einleitung

Clonazepam (Ro 5 - 4023), ein von der Firma Hoffmann - La Roche entwickeltes Antiepilepticum steht seit 1968 in experimenteller und klinischer Erprobung und ist derzeit in einigen Ländern, wie z.B. in Österreich und der Schweiz bereits unter dem Namen Rivotril im Handel. Chemisch gesehen handelt es sich um: 5 - o - Chlorphenyl - 1,3 - dihydro - 7 - nitro - 2H - 1,4 - benzodiazepin - 2 - on



Es haben sich bis jetzt einige Vorteile in der Epilepsiebehandlung gegenüber den herkömmlichen Medikamenten herausgestellt. Clonazepam zeichnet sich besonders durch das "breitere Wirkungsspektrum und die größere Konstanz seiner antikonvulsiven Wirkung" aus (13).

Die außerordentlich günstige Wirkung auf den Status epilepticus konnte von mehreren Autoren aufgezeigt werden. Bei der Prüfung handelte es sich in den meisten Fällen um chronisch dekompensierte, therapieresistente Epileptiker. Nach Ketz et al. (22)

gilt Clonazepam beim Status epilepticus jeglicher Genese, d.h. primär generalisiert oder fokal beginnend mit sekundärer Generalisation, als Mittel der ersten Wahl. Dazu zählen auch subklinische Anfälle, Petit - mal Status, Dämmer- und Erregungszustände. Auch bei den bisher therapieresistenten Epilepsieformen wie Myoklonien, West - Syndrom und Lennox - Syndrom (= myoklonisch astatisches Petit - mal) zeigten sich nach Gastaut (11) und Castro - viejo (7) Erfolge. Bei Blitz - Nick - Salaam Krämpfen jedoch bringt Clonazepam keine wesentliche Bereicherung der Therapiemöglichkeiten (13), da nach Martin (25) insbesondere beim Säugling als Folge von Hypersalivation und vermehrtem Bronchialsekret respiratorische Störungen auftreten. Es zeigen sich außerdem sehr gute Ergebnisse bei Petitmal Absencen, wobei es bei der Behandlung im Gegensatz zu anderen Medikamenten, wie Succinimide, Dione oder Valium keine Grand - mal - Anfälle hervorruft, sondern vielmehr verringert (11). Ein guter Effekt zeigt sich auch bei der Behandlung von Grand - mal - Anfällen, weniger zufriedenstellende Ergebnisse zeigen sich bei den psychomotorischen Anfällen. Dies wird darauf zurückgeführt, daß der Angriffspunkt von Clonazepam vorwiegend am Cortex zu suchen ist. Es verstärkt die Synchronisierungstendenz der elektrischen Cortexaktivität und verhindert

eine Ausbreitung elektrischer Krampfpotentiale über die Hirnrinde. Da der Entstehungsort psychomotorischer Anfälle im Temporallappen und damit im limbischen Strukturen zu suchen ist, wäre erklärt, daß sie von Clonazepam nur mäßig beeinflußt werden (12). Über den genauen Angriffspunkt von Clonazepam scheint es jedoch noch Widersprüchlichkeiten zu geben, da an anderer Stelle hervorgehoben wird, daß sich Teile des limbischen Systems und des Thamalus als besonders empfindlich erweisen (4). Zur Beseitigung eines Krampfanfalls sind bei Clonazepam 5 bis 10 mal niedrigere Dosen als bei den Benzodiazepinen Nitrazepam (Mogadon) und Diazepam (Valium) nötig (4). Es weist eine befriedigende Verträglichkeit auf und führt nicht zu toxischen Erscheinungen. Die Nebenwirkungen, die bei der Langzeitbehandlung mit Clonazepam auftreten, sind größtenteils auf seine sedierende und muskelrelaxierende Wirkung zurückzuführen ("Rivotril Roche", Informationsheft von Hoffmann-La Roche). Besonders zu Therapiebeginn treten Somnolenz und Mattigkeit, ein herabgesetzter Muskeltonus (unter der Symptomatik von Gang-, Sprach-, Defäkations- und Miktionsstörungen) und Verhaltensschwierigkeiten (psychische Verlangsamung bzw. Reizbarkeit und Aggressivität) auf. Die Nebenwirkungen klingen jedoch nach einigen Wochen von selbst ab. Um das

Auftreten dieser initialen Nebenwirkungen weitgehend zu vermeiden, scheint es sinnvoll, die Anfangsdosis niedrig zu wählen und nur sehr langsam zu steigern (13). Nach Weinmann und Willms (44) soll der sedierende Effekt nach intravenöser Injektion im Vergleich zu Valium wesentlich geringer sein, dagegen beobachteten sie eine mehr oder minder ausgeprägte Tachykardie, die 10 bis 20 Minuten über das Injektionsende hinaus bestand. Bei regelmäßigen Blut-, Harn - oder Leberkontrollen stellte Rett (29) fest, daß "in keinem der untersuchten Bereiche bei den Kontrollen Veränderungen gefunden wurden, die mit Sicherheit auf Clonazepam zurückgeführt werden konnten". Girke et al. (12) konnten jedoch bei ihren Untersuchungen eine reversible Verminderung der Thrombozytenwerte nachweisen.
Beer et al. (1) berichten in ihren Studien, daß verschiedene Psychopharmaka die Bildung von cyclischem Adenosin 3',5'- Monophosphat (= cyclo-AMP) im Gehirn beeinflussen. Cyclo - AMP, von Sutherland als "second messenger" bezeichnet, wirkt in der Zelle auf verschiedene Prozesse ein (21). Es spielt bei der Regulierung der Glykogeno - lyse (30, 42) und der Lipolyse (5) höchstwahrscheinlich eine wichtige Rolle. Mit Hilfe von Hormonen, wie Adrenalin, Glukagon und einigen anderen Peptidhormonen, die in der Zellmembran das

Adenylatcyclasesystem stimulieren, wird ATP in cyclo - AMP verwandelt. Das cyclo - AMP wird in der Zelle durch Phosphodiesterasen zu 5'- AMP abgebaut. Man hat gefunden, daß das Gehirn die höchsten Spiegel an den Enzymen Adenylatcyclase und Phosphodiesterase enthält, welche für den Auf - bzw. Abbau des cyclo - AMP verantwortlich sind (6, 8, 43). Es scheint deshalb wahrscheinlich, daß sie auch an der Regulation nervöser Aktivitäten teilnehmen (38). Die Höhe des cyclo - AMP - Spiegels im Gehirn hängt also davon ab, inwieweit die Adenylatcyclase stimuliert oder die Phosphodiesterase gehemmt wird. Die Benzodiazepine sind als kompetitive Hemmer der Phosphodiesterase bekannt geworden (3). Außerdem konnte die cyclo - AMP - Bildung durch Stimulation der Adenylatcyclase im Gehirn nach Inkubation mit biogenen Aminen wie Histamin, Noradrenalin oder 5 - Hydroxytryptamin (15, 18, 38), durch elektrische Stimulation (20, 38) oder durch Adenosin erhöht werden (16, 19).

In der vorliegenden Arbeit soll dargestellt werden, auf welche Weise die cyclo - AMP - Bildung im Gehirn durch Noradrenalin und Adenosin bei mit Clonazepam vorbehandelten Ratten beeinflußt wird.

II. Methoden

1. Vorbehandlung

Zu den Versuchen wurden 88 männliche Sprague - Dawley Ratten mit einem durchschnittlichen Gewicht von 200 g verwendet. Die Verabreichung des Medikaments wurde täglich zwischen 8 und 10 Uhr vormittags vorgenommen. Sie erhielten 1 ml Arzneimittelsuspension pro 200 g Körpergewicht, was einer Dosis von 5 mg/ Kg/ die entspricht. Die Applikation erfolgte mittels einer Schlundsonde. Da Clonazepam in Wasser unlöslich ist, wurde eine 3,5 %ige wässrige Gelatinelösung hergestellt, die 100 mg Wirksubstanz in 100 ml enthielt. Durch Homogenisieren ist eine fein verteilte Suspension erzielt worden, die eine gleichmäßige Dosierung erlaubte. Beim gelegentlichen Absinken der Wirksubstanz konnte diese durch Umschütteln sofort wieder suspendiert werden. Die Kontrollratten erhielten 1 ml einer 3,5 %igen reinen Gelatinelösung, um sie derselben mit der Verabreichung verbundenen Streßsituation auszusetzen. Nach 1, 3, 6, 10, 15 und 21 Tagen Vorbehandlung wurden pro Versuchstag jeweils 4 bis 11 Tiere getötet und für die Experimente herangezogen.

2. Präparation und Inkubation von Gehirnschnitten

24 Stunden nach der letzten Applikation des Medikamentes wurden die Tiere mit Hilfe einer Guillotine dekapitiert und die Schädelkalotte eröffnet. Das daraus entnommene Gehirn wurde sofort in eiskalten Krebs - Ringer Bicarbonat - puffer (KR - Medium) gelegt. Auf einer eisgekühlten Aluminiumfolie wurde das Gehirn in sagittaler Richtung halbiert und die Gehirnrinde (Cortex cerebri) unter Entfernung aller übrigen Gehirnanteile freipäpariert. Der Balken (Corpus callosum), der sich als gut sichtbare weiße Schicht direkt unter der Gehirnrinde darstellt, wurde zuletzt vorsichtig abgezogen. In einer zweiten Versuchsreihe wurde außer dem Cortex cerebri auch das Mittelhirn mit Corpus striatum, zu dem der Nucleus caudatus, Putamen und Globus pallidus zählt, der Thamalus, Hypothamalus und Hippocampus verwendet. Hier wurde bei der Präparation zuerst Kleinhirn (Cerebellum) und Brücke (Pons) verworfen, der Hypothamalus abgetrennt und daraufhin ein frontaler Schnitt in Höhe des Chiasma opticum gelegt. Aus dem vorderen Anteil wurden die Striatumstrukturen herausgenommen und das Corpus callosum vorsichtig abgezogen. Aus dem größeren hinteren Anteil wurden alle subcortikalen Struktu-

ren zusammen mit dem Corpus callosum herausgeschält (14). In dem folgenden Versuchsablauf wurde beim Mittelhirn genauso vorgegangen wie beim Cortex cerebri. Die Gehirnrinde wurde auf einem Schneidegerät (Mc Illwain Tissue Chopper) in 260 µm dicke Schnitte zerkleinert und sofort in ein mit 30 ml KR - Medium gefülltes Becherglas gegeben, das im Wasserbad auf 37° C vorgewärmt worden war. Bei allen Inkubationen wurde mit "Carbogen" (95 % O_2, 5 % CO_2) zur Aufrechterhaltung eines pH von 7,4 und zur Sauerstoffsättigung begast. Nach einer Inkubation, die 10 Minuten lang dauerte, wurde nach Absetzen der Schnitte der Überstand mit dem entstandenen Schaum abgesaugt (Wasserstrahlpumpe), mit 30 ml vorgewärmtem KR - Medium gewaschen und anschließend 16 ml KR - Lösung, die 4 µM an Adenin war, dazugegeben. Nun wurde 40 Minuten lang inkubiert. Danach wurden die Schnitte 3 mal wie oben gewaschen, 10 Minuten inkubiert und darauf mit einer weiten Pipette auf kleine Bechergläser, die jeweils 9,5 ml KR - Medium und verschiedene die cyclo - AMP - Bildung stimulierende Agenzien enthielten, verteilt.
Bei der ersten Versuchsreihe wurden verwendet: Noradrenalin, Isoprenalin und Adenosin; als Phosphodiesterasehemmer kamen Diazepam allein und Diazepam in Verbindung mit Noradrenalin und

Isoprenalin zur Verwendung. Noradrenalin und Isoprenalin wurden erst kurz vor der Hauptinkubation zugegeben, da diese beiden Substanzen leicht oxidieren. In den darauffolgenden Versuchsreihen wurde nur noch mit Noradrenalin und Adenosin gearbeitet. Für das Mittelhirn wurde nur Noradrenalin als Stimulans verwendet. Die Testsubstanzen wurden so in Wasser gelöst, daß eine 10 mM Konzentration erreicht wurde. Davon wurden dann jeweils 100 µl der Inkubation zugefügt, sodaß die Endkonzentration 0,1 mM an Agens war.
Es folgte nun die Hauptinkubation von 15 Minuten. Die Schnitte, die zur Kontrolle dienten, wurden zur Zeit t=0 abfiltriert (Wasserstrahlvakuum) und das Gewebe mit einem Spatel in einen Glas - homogenisator, der 1 ml Trichloressigsäure und Träger ^{14}C - cyclo - AMP (1n Curie/ 10 pMol) enthielt, gebracht, homogenisiert und bei 3500 UpM zentrifugiert. Nach 15 Minuten wurden die übrigen Schnitte ebenfalls abfiltriert und homogenisiert.

3. Isolierung von cyclo - AMP

Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand in den Homogenisatoren abpipettiert und zur Entfernung der Trichloressigsäure 4 mal mit Diäthyläther extrahiert. Anschließend wurde die cyclo - AMP -

haltige wäßrige Phase zur Reinigung auf eine Kationenaustauschersäule (Dowex - 50 x 8, 100 - 200 mesh, Säulenmaße: 5 x 70 mm) gegeben und mit ca. 15 ml destilliertem Wasser nachgespült. Es wurde nun das cyclo - AMP mit etwa 3 ml HCl (0,1 N) eluiert. Das Eluat wurde lyophilisiert und je nach Höhe des zu erwartenden cyclo - AMP - Gehaltes in 0,5 ml oder 1 ml Natriumacetatpuffer (0,05 M, pH 4) gelöst. Die Hälfte der Lösung wurde in ein Zählglas gegeben und mit 0,05 M Natriumacetatlösung auf 1 ml aufgefüllt. Zuletzt wurde noch 6 ml einer Szintillationsflüssigkeit (Bray) hinzugefügt und die Ausbeute an cyclo - AMP im Flüssigkeits - Szintillationszähler gemessen. Diese lag bei durchschnittlich 40 - 80 %. Die andere Hälfte der Lösung wurde für die Bestimmung des Gehaltes an unmarkiertem cyclo - AMP nach der Methode von Gilman verwandt.

Für die weiteren Experimente wurde im Laboratorium ein neues Verfahren zur Proteindenaturierung entwickelt, bei dem statt Trichloressigsäure 1 ml 0,4 N Perchlorsäure verwendet wurde. Der Überstand wurde dann mit 100 µl Trislösung (Tris - hydroxymethyl - aminomethan) neutralisiert. Damit war die 4 malige Ätherextraktion überflüssig geworden. Zur Reinigung wurde jetzt ein Anionen - austauscher, Dowex, 1 x 8, 200 - 400 mesh, benutzt.

4. Gilman - Test

Bei der cyclo - AMP - Bestimmung nach Gilman wird die Tatsache ausgenutzt, daß eine bestimmte Menge einer cyclo - AMP - abhängigen Proteinkinase bei der Sättigungskonzentration von cyclo - AMP immer die gleiche Menge cyclo - AMP bindet. Der entstandene cyclo - AMP - Enzymkomplex kann durch Filtration von ungebundenem cyclo - AMP getrennt werden. Geht man von einer bestimmten Menge radioaktiv markiertem cyclo - AMP aus, so findet bei Zusatz von unmarkiertem cyclo - AMP eine Isotopenverdünnung statt und es wird entsprechend weniger radioaktives cyclo - AMP an die Proteinkinase gebunden. Die Menge an gebundenem radioaktiven cyclo - AMP wird im Flüssigkeits - Szintillationszähler bestimmt. Anhand einer Eichkurve, die für jeden Test neu aufgenommen wird, kann so der cyclo - AMP - Gehalt von Versuchsproben bestimmt werden. Die Ergebnisse wurden mit einem Kleincomputer (Hewlett & Packard HP 65) ausgerechnet.

5. Proteinbestimmung

Zur Proteinbestimmung wurde der Rückstand in den Homogenisatoren in 1 ml Natriumdesoxycholatlösung gelöst und in kleine Reagenzgläser eingewogen.

Von jeder Probe wurden 0,3 ml und 0,6 ml abpipettiert und mit Wasser auf jeweils 2,5 ml aufgefüllt. Zuletzt wurden 2,5 ml Biuretlösung dazugegeben und die Extinktion nach 30 Minuten im Photometer bei 546 nm gegen eine Kontrolle mit 2,5 ml destilliertem Wasser und 2,5 ml Biuretlösung bestimmt. Der Proteingehalt wurde dann aus dem Gewicht der Proben über einen im Labor bekannten Faktor von 16,5 und den beiden Extinktionswerten in mg berechnet.

6. Versuche mit unbehandelten Ratten

Bei einer letzten Versuchsreihe wurden vom Cortex cerebri unbehandelter Ratten wie unter II,2 beschrieben Gewebeschnitte hergestellt und inkubiert. Folgende Hauptinkubationen wurden durchgeführt: Noradrenalin, Noradrenalin + Clonazepam (3 µg/ml) Noradrenalin + 7 - Acetamido - Clonazepam (3 µg/ml), Adenosin , Adenosin + Clonazepam (3 µg/ml), Adenosin + 7 - Acetamido - Clonazepam. Die Konzentrationen von Clonazepam und seinem Metabolit 7 - Acetamido - Clonazepam wurden so gewählt, wie sie annähernd beim lebenden Tier erreicht werden dürften. Alle anderen Schritte waren diesselben wie unter II,2, II,3, II,4 und II,5.

III. Material

Männliche Sprague - Dawley - Ratten (ca. 200 g) von der Firma Ivanovas (Kisslegg, Allgäu)

Clonazepam (Ro 5 - 4023) und 7 - Acetamido - Clonazepam wurde dankenswerterweise von der Firma Hoffmann - La Roche Grenzach/ Baden zur Verfügung gestellt

^{14}C - cyclo - AMP, 50 mC/ mMol von New England, Nuclear, Boston, USA

^{3}H - cyclo - AMP, 37 C/ mMol von Amersham - Buchler (Braunschweig)

Adenosin, Isoprenalin und Noradrenalin von Calbiochem (San Diego, USA)

Dowex - Ionenaustauscher: Type 50 x 8, 100 - 200 mesh und Type 1 x 8, 200 - 400 mesh von Serva (Heidelberg)

Alle anderen Substanzen waren von Merck (Darmstadt)

Biuretlösung:
30 mMol $CuSO_4$
58 mMol K - Na - Tartrat
30 mMol KJ
200 ml 1 N NaOH
800 ml Aqua dest.

Krebs - Ringer - Medium:

122	mMol NaCl
10	mMol D - Glucose
25	mMol $NaHCO_3$
3	mMol KCl
1,2	mMol $MgSO_4$
0,4	mMol K_2HPO_4
1,3	mMol $CaCl_2$
1000	ml Aqua dest.

Die experimentellen Daten sind in den Tabellen aufgeführt, daneben wurden die dort aufgeführten Werte noch graphisch in den Abbildungen dargestellt. Auf eine Einzeichnung der Standardfehler wurde dabei verzichtet. Durch Verzerrung der Maßstäbe werden dabei manchmal scheinbar überhöhte Veränderungen beobachtet, die in Verbindung mit dem Standardfehler der Tabellen gesehen werden müssen.

IV. Ergebnisse

Die Behandlung der Tiere mit Clonazepam erstreckte sich über 3 Wochen. Während dieser Zeit nahmen sie täglich ca. 5 g an Körpergewicht zu, dabei war kein wesentlicher Unterschied zwischen den mit Placebo und den mit Clonazepam behandelten Tieren zu beobachten (Tabelle 1, Abb. 1).
Bei den Kontrolltieren lag der cyclo - AMP - Basalspiegel in der Gehirnrinde bei 15 pMol/mg Protein, im Mittelhirn bei 5 pMol/mg Protein (Tabelle 2). Nach Stimulierung der Adenylatcyclase mit Noradrenalin stieg in der Gehirnrinde der cyclo - AMP - Spiegel auf 51 pMol/mg Protein, im Mittelhirn auf 16 pMol/mg Protein an (Tabelle 3). Wurde Adenosin zur Stimulierung der Adenylatcyclase verwendet, so zeigte sich gegenüber den Kontrollwerten ein Anstieg des cyclo - AMP - Spiegels auf 62 pMol/mg Protein in der Gehirnrinde (Tabelle 4). Die Ergebnisse der einzelnen Tage waren Schwankungen unterworfen, die in Bereichen lagen, wie sie bei biologischem Untersuchungsmaterial üblich sind. Aus den einzelnen Tageskontrollwerten wurden die oben angegebenen Gesamtkontrollwerte errechnet, die auch am Ende der Tabellen aufgeführt sind. Wurden die Tiere mit Clonazepam vorbehandelt, so zeigt sich gegenüber den mit Placebo behandelten

Tieren keine signifikante Veränderung der Empfindlichkeit des Adenylatcyclasesystems auf Stimulierung mit Noradrenalin; das gilt sowohl für den Bereich des Cortex cerebri als auch für den des Mittelhirns und der Basalganglien (Tabelle 3, Abb. 3,6)

Nach Stimulierung des cyclo - AMP - Systems mit Adenosin wird 3 und 6 Tage nach Beginn der Behandlung ein Anstieg des cyclo - AMP - Spiegels in der Gehirnrinde deutlich, der über den vergleichbaren Kontrollwerten liegt. Ein statistisch signifikanter Effekt zeigt sich jedoch erst am 10. Tag nach Behandlungsbeginn. Diese Erhöhung der cyclo - AMP - Bildung als Antwort auf eine Stimulierung mit Adenosin, die um 41,8 % über dem Tageskontrollwert lag, ging am 15. Tag wieder zurück (Tab. 4, Abb. 4).

Bei der ersten Versuchsreihe wurde Cortexgewebe mit Noradrenalin, Isoprenalin, Noradrenalin + Diazepam, Isoprenalin + Diazepam und Diazepam allein inkubiert. Zur Auswertung dieser Experimente wurden die Ergebnisse aller Versuchstage zusammengenommen. Wurden die Ratten mit Placebo behandelt, so wurden bei den Inkubationen, die Diazepam enthielten, immer erhöhte cyclo - AMP - Werte gegenüber den entsprechenden Kontrollinkubationen gefunden. Eine statistisch signifikante Anhäufung von cyclo - AMP wurde jedoch nur bei Inkubation mit Isoprenalin +

Diazepam gegenüber Isoprenalin allein beobachtet. Wurden Gehirnschnitte von Ratten verwendet, die mit Clonazepam vorbehandelt wurden, so waren die Anhäufungen von cyclo - AMP immer signifikant erhöht, wenn Diazepam zusätzlich in der Inkubationslösung enthalten war. Dabei stiegen die cyclo - AMP - Werte bei der Inkubation mit Noradrenalin + Diazepam gegenüber Noradrenalin allein um 58,3 %, bei der Inkubation mit Isoprenalin + Diazepam um 74,3 % gegenüber Isoprenalin allein und bei der Inkubation mit Diazepam allein sogar um 156,4 % gegenüber dem Kontrollwert an (Tabellen 5 und 6, Abb. 7).

Wurden Gewebeschnitte des Cortex cerebri von unbehandelten Ratten mit Noradrenalin + Clonazepam (3 µg/ml) inkubiert, so konnte eine Erhöhung der cyclo - AMP - Anhäufung gegenüber Noradrenalin allein beobachtet werden. Wurden dieselben Gewebeschnitte mit Noradrenalin + 7 - Acetamido - Clonazepam (3 µg/ml) inkubiert, wurde eine etwas geringere Anhäufung von cyclo - AMP gegenüber Noradrenalin allein gefunden. Bei Inkubation mit Adenosin + Clonazepam (3 µg/ml) war ebenfalls eine erhöhte Anhäufung von cyclo - AMP gegenüber Adenosin allein zu sehen, nicht jedoch bei der Inkubation Adenosin + 7 - Acetamido - Clonazepam gegenüber Adenosin allein (Tabelle 7, Abb. 8).

Tabelle 1

Gewichtszunahme der mit Placebo und mit Clonazepam vorbehandelten Ratten. Die Gewichte sind in g und mit ihrer Standardabweichung angegeben. Die Anzahl der Tiere steht in Klammern.

Dauer der Behandlung (Tage)	1	6	10	15	21
Placebo	174 ± 12 (76)	195 ± 12 (47)	224 ± 15 (34)	249 ± 16 (25)	273 ± 16 (14)
Clonazepam 5mg/kg Körpergewicht	184 ± 14 (59)	201 ± 12 (42)	227 ± 14 (31)	256 ± 15 (19)	277 ± 18 (8)

Tabelle 2

Beeinflussung des cyclo - AMP - Basalspiegels in Gewebeschnitten des Cortex cerebri sowie des Mittelhirns und der Basalganglien der Ratte nach Behandlung mit Clonazepam und Placebo. Die Ergebnisse sind angegeben in pMol/mg Protein ± ihren Standardfehlern. In Klammern steht die Anzahl der getrennt durchgeführten Versuche.

Gehirnstrukturen	Vorbehandlung mit	Tag 1	Tag 3	Tag 6	Tag 10	Tag 15	Tag 21	Gesamtkontrollwert
Cortex cerebri	Placebo	17±3(10)	14±2(12)	14±2(12)	15±2(12)	14±2(9)	15±2(12)	15 ±1 (67)
	Clonazepam	14±1(5)	15±2(10)	15±1(9)	18±2(11)	18±2(11)	15±3(8)	
Mittelhirn-Basalganglien	Placebo	6±1 (4)	8±2(4)	4±0(4)	4±1(4)	5±2(2)	6±1(4)	5 ± 1 (22)
	Clonazepam	6±1 (3)	6±2(3)	5±1(4)	4±1(4)	4±1(2)	4±1(4)	

Tabelle 3

Beeinflussung des cyclo - AMP - Spiegels in Gewebeschnitten des Cortex cerebri sowie des Mittelhirns und der Basalganglien der Ratte nach Behandlung mit Clonazepam und Placebo durch Stimulierung der Adenylatcyclase mit Noradrenalin. Die Ergebnisse sind angegeben in pMol/mg Protein ± ihren Standardfehlern. In Klammern steht die Anzahl der getrennt durchgeführten Versuche.

Gehirnstrukturen	Vorbehandlung mit	Tag 1	Tag 3	Tag 6	Tag 10	Tag 15	Tag 21	Gesamtkontrollwert
Cortex cerebri	Placebo	60±18(5)	44±7(6)	55± 9(6)	38±8(6)	47±16(3)	59±11(6)	51±4(32)
	Clonazepam	56±8(5)	64±9(10)	50±7(9)	56±9(11)	53±10(4)	48±7(10)	
Mittelhirn-Basalganglien	Placebo	19±6(3)	20±3(4)	14± 1(4)	14±5(4)	10±1(2)	18±3(4)	16±1(21)
	Clonazepam	20±4(4)	25±3(4)	12±2(4)	15±3(4)	12±7(2)	14±4(4)	

Tabelle 4

Beeinflussung des cyclo - AMP - Spiegels in Gewebeschnitten des Cortex cerebri der Ratte nach Behandlung mit Clonazepam und Placebo durch Stimulierung der Adenylatcyclase mit Adenosin. Die Ergebnisse sind angegeben in pMol/mg Protein ± ihren Standardfehlern. In Klammern steht die Anzahl der getrennt durchgeführten Versuche.

Vorbehandlung mit	Tag 1	Tag 3	Tag 6	Tag 10	Tag 15	Tag 21	Gesamtkontrollwert
Placebo	66 ± 15(5)	61 ± 6(6)	62 ± 9(6)	50 ± 11(6)	74 ± 39(3)	68 ± 14(6)	62±5(32)
Clonazepam	62 ± 9(5)	79 ± 6(10)	77 ± 11(7)	89 ± 9(11)$^{+}$	60 ± 8(4)	75 ± 10(10)	

$^{+}$: $p < 0,05$

Tabelle 5

Beeinflussung des cyclo - AMP - Spiegels in Gewebeschnitten des Cortex cerebri der Ratte nach Behandlung mit Placebo durch Zusatz von Diazepam zur Inkubationslösung, die Noradrenalin oder Isoprenalin zur Stimulierung der Adenylatcyclase enthält. Die Ergebnisse sind angegeben in pMol/mg Protein ± ihren Standardfehlern. In Klammern steht die Anzahl der getrennt durchgeführten Versuche.

	Stimulierung der Adenylatcyclase mit		
Zusatz	Nichts	Noradrenalin	Isoprenalin
Nichts	26 ± 4 (6)	77 ± 17 (6)	41 ± 7 (6)
Diazepam 0, 25 mM	34 ± 6 (6)	137 ± 37 (6)	92 ± 21 (5)+

+: $p < 0,05$

Tabelle 6

Beeinflussung des cyclo - AMP - Spiegels in Gewebeschnitten des Cortex cerebri der Ratte nach Behandlung mit Clonazepam durch Zusatz von Diazepam zur Inkubationslösung, die Noradrenalin oder Isoprenalin zur Stimulierung der Adenylatcyclase enthält. Die Ergebnisse sind angegeben in pMol/mg Protein ± ihren Standardfehlern. In Klammern steht die Anzahl der getrennt durchgeführten Versuche.

	Stimulierung der Adenylatcyclase mit		
Zusatz	Nichts	Noradrenalin	Isoprenalin
Nichts	19 ± 3 (6)	127 ± 15 (6)	72 ± 11 (6)
Diazepam	48 ± 9 (6)$^{+}$	200 ± 27 (6)$^{+}$	126 ± 21 (6)$^{+}$

$^{+}$: $p < 0,05$

Tabelle 7

Erhöhung der cyclo - AMP - Bildung bei Inkubation von Gehirnrindenschnitten nicht vorbehandelter Ratten mit Clonazepam und 7 - Acetamidoclonazepam in einer Konzentration von 3 µg/ml und gleichzeitiger Stimulierung mit Noradrenalin und Adenosin. Von den erhaltenen Werten wurde der jeweilige Kontrollwert subtrahiert, sodaß die effektive Erhöhung von cyclo - AMP über dem Basalspiegel angegeben ist. Die cyclo - AMP - Werte sind in pMol/mg Protein ± ihrem Standardfehler aufgeführt. Die Anzahl der Versuche steht in Klammern.

Zusätze	Noradrenalin	Adenosin
nichts	30 ± 2 (3)	40 ± 2 (3)
Clonazepam	38 ± 6 (3)	45 ± 6 (3)
7-Acetamido-clonazepam	35 ± 9 (3)	40 ± 6 (3)

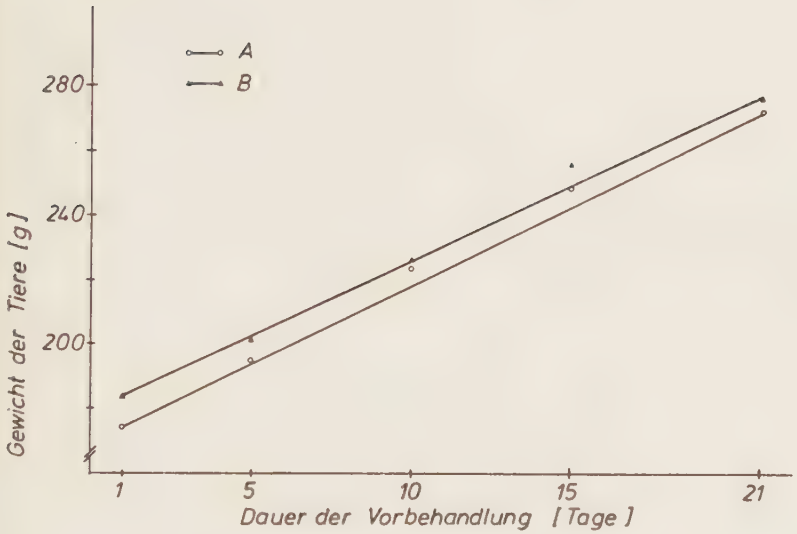


Abb. 1: Einfluß der Behandlung mit Placebo (A) und Clonazepam (B) auf die Gewichtszunahme der Tiere.

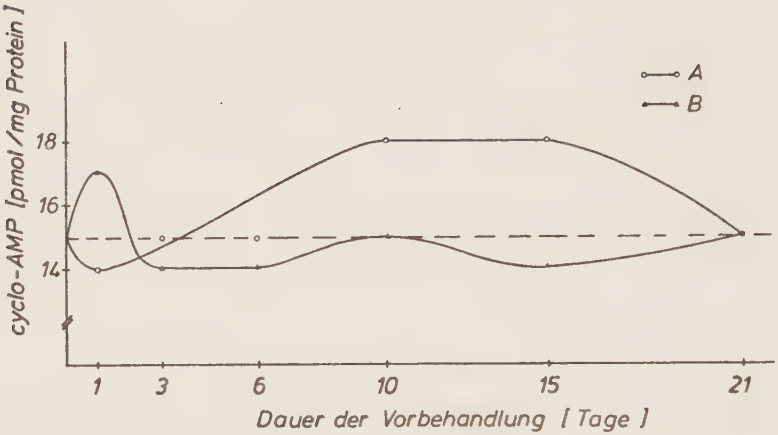


Abb. 2: Cyclo - AMP - Basalspiegel in Gewebeschnitten des Cortex cerebri nach Vorbehandlung mit Clonazepam (A) und Placebo (B). Die gestrichelte Linie gibt den Gesamtkontrollwert an, der als arithmetisches Mittel der Tageskontrollwerte (Behandlung mit Placebo) errechnet wurde.

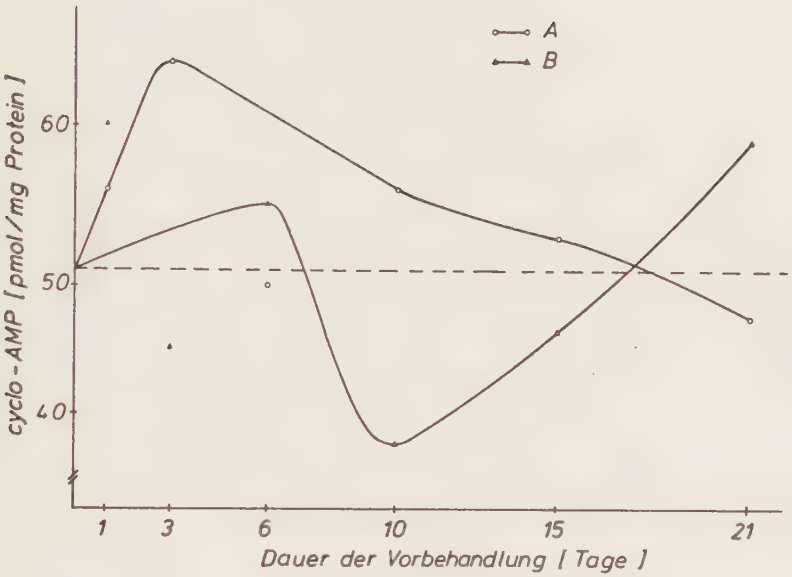


Abb. 3: Cyclo - AMP - Spiegel nach Stimulierung der Adenylatcyclase mit Noradrenalin in Gewebeschnitten des Cortex cerebri. Vorbehandlung der Ratten mit Clonazepam (A) und Placebo (B). Die gestrichelte Linie gibt den Gesamtkontrollwert an, der als arithmetisches Mittel der Tageskontrollwerte (Behandlung mit Placebo) errechnet wurde.

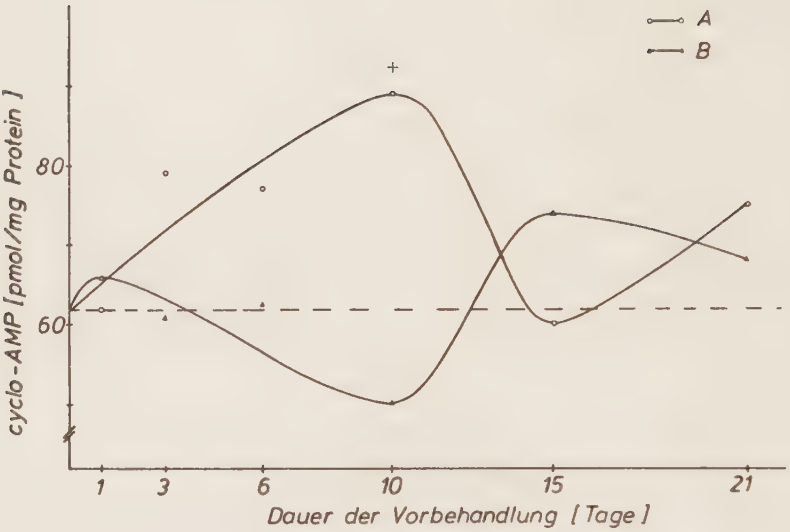


Abb. 4: Cyclo - AMP - Spiegel nach Stimulierung der Adenylatcyclase mit Adenosin in Gewebeschnitten des Cortex cerebri. Vorbehandlung der Ratten mit Clonazepam (A) und Placebo (B). Die gestrichelte Linie gibt den Gesamtkontrollwert an, der als arithmetisches Mittel der Tageskontrollwerte (Behandlung mit Placebo) errechnet wurde.
Am Tag 10 wurde eine signifikante Erhöhung des cyclo - AMP - Spiegels beobachtet.
+: $p < 0,05$

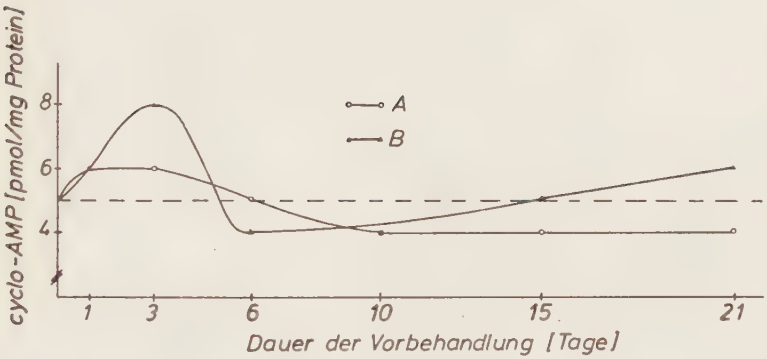


Abb. 5: Cyclo - AMP - Basalspiegel in Gewebeschnitten des Mittelhirns und der Basalganglien nach Vorbehandlung mit Clonazepam (A) und Placebo (B). Die gestrichelte Linie gibt den Gesamtkontrollwert an, der als arithmetisches Mittel der Tageskontrollwerte (Behandlung mit Placebo) errechnet wurde.

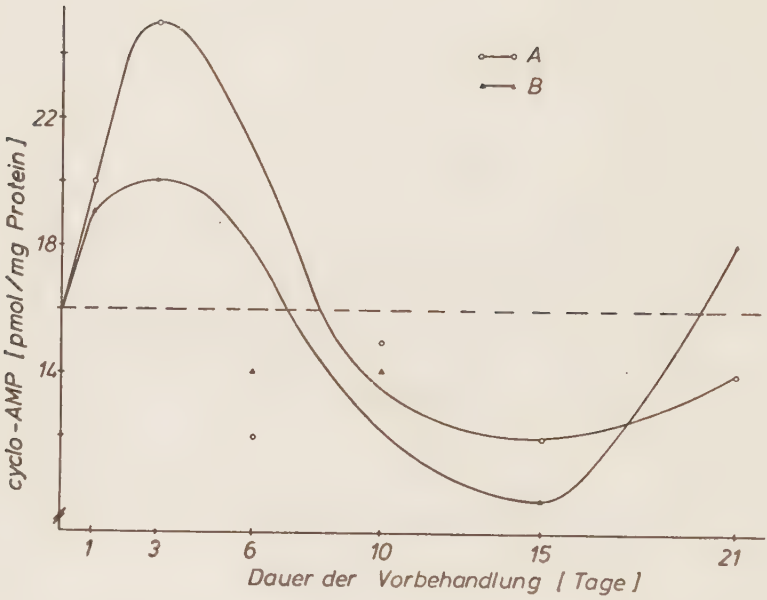


Abb. 6: Cyclo - AMP - Spiegel nach Stimulierung der Adenylatcyclase mit Noradrenalin in Gewebeschnitten des Mittelhirns und der Basalganglien. Vorbehandlung der Ratten mit Clonazepam (A) und Placebo (B). Die gestrichelte Linie gibt den Gesamtkontrollwert an, der als arithmetisches Mittel der Tageskontrollwerte (Behandlung mit Placebo) errechnet wurde.

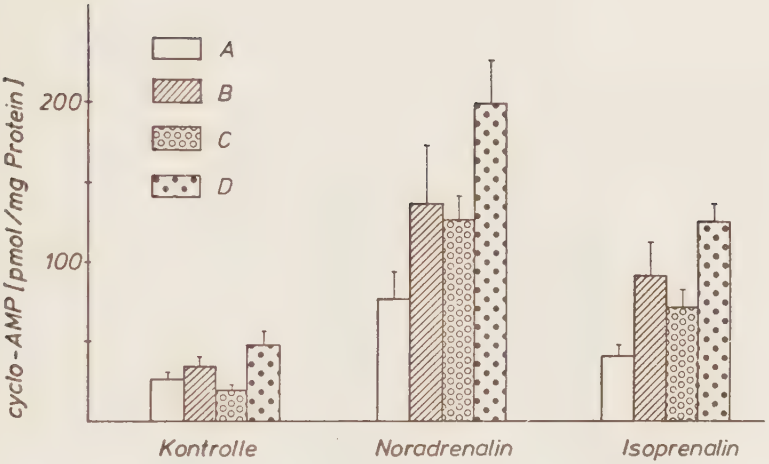


Abb. 7: Beeinflussung des cyclo - AMP - Spiegels in Gewebeschnitten des Cortex cerebri durch den Zusatz von Diazepam in der Inkubationslösung (Endkonzentration 0,25 mM) und Vorbehandlung mit Clonazepam und Placebo. Hierfür wurden die Ergebnisse aller Versuchstage zusammengenommen.

A = Behandlung der Tiere mit Placebo, Inkubation ohne Diazepam

B = Behandlung der Tiere mit Placebo, Inkubation mit 0,25 mM Diazepam

C = Behandlung der Tiere mit Clonazepam, Inkubation ohne Diazepam

D = Behandlung der Tiere mit Clonazepam, Inkubation mit 0,25 mM Diazepam

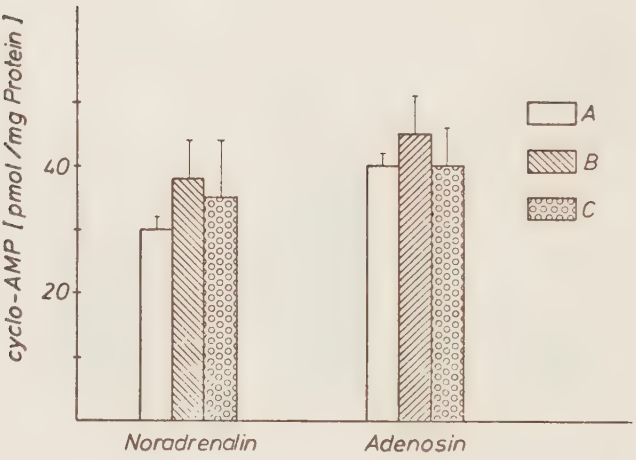


Abb. 8: Cyclo - AMP - Anstieg in Gewebeschnitten des Cortex cerebri von unbehandelten Ratten nach Stimulierung der Adenylatcyclase mit Noradrenalin und Adenosin. Den Inkubationslösungen wurde Clonazepam (3 µg/ml) und 7 - Acetamido - Clonazepam (3 µg/ml) zugegeben.

A = kein Zusatz

B = Inkubationslösung mit Clonazepam (3 µg/ml)

C = Inkubationslösung mit 7 - Acetamido - Clonazepam (3 µg/ml)

Angegeben ist der effektive cyclo - AMP - Anstieg nach Abzug des Kontrollwertes.

Diskussion

Da Clonazepam in der Epilepsiebehandlung meistens über lange Zeit, d. h. oft über mehrere Jahre hinweg gegeben werden muß, schien es sinnvoll, in der vorliegenden Arbeit seine Wirkungsweise auf biochemisch meßbare Parameter bei länger dauernder Anwendung zu prüfen. Die orale Gabe des Medikaments wurde vorgezogen, da tägliche intraperitoneale Injektionen Infektionen und Nekrosen im Peritoneum hervorrufen können. Die Dosierung von 5 mg/kg/die wurde deshalb gewählt, da aus der Literatur zu entnehmen war, daß bei Ratten hier die antikonvulsive Wirkung sehr ausgeprägt ist. Es wurde jedoch auch eine Behandlung von 78 Wochen mit einer Dosis von 50 mg pro kg ohne toxische Erscheinungen (= das 500 fache der therapeutischen Dosis bei einem Menschen von 60 kg) vertragen. Die akute orale LD_{50} Dosis liegt bei der Ratte erst bei über 4000 mg/kg. Da bei 5 mg/kg/die jedoch eine stärkere Hemmung der Aggressivität als der Aktivität beschrieben wird ("Rivotril Roche", Informationsheft von Hoffmann - La Roche), wurde diese niedrigere Dosis gewählt. Die Abnahme der Aggressivität kam auch bei uns bei der Applikation des Medikaments im Vergleich zu den mit Placebo behandelten Kontrolltieren deutlich zum Ausdruck.

Stein et al. (41) zeigten, daß der Antiaggressionseffekt der Benzodiazepine zu Veränderungen der 5 - Hydroxytryptophan - Umsetzung in Mittelhirnregionen der Ratte in Beziehung gebracht werden kann. In einer Studie von Fennessy und Lee ist Clonazepam das einzige Benzodiazepinderivat, das die 5 - Hydroxytryptophan - Spiegel im Gehirn signifikant erhöht (9).

Untersuchungen von Petsche (28) zeigten, daß Clonazepam direkt auf den Säugetiercortex wirkt. Es soll die Synchronisierungstendenz des Cortex verstärken und die Ausbreitung der elektrischen Krampfpotentiale verhindern (12). Die Störfaktoren, die zu epileptischen Entladungen führen, sind zum größten Teil noch unbekannt. Es kommt jedoch z.B. im großen generalisierten tonischklonischen Anfall zu einer erhöhten Permeabilität der Nervenzellmembran mit einer Depolarisation und einer mangelnden Repolarisation der Zelle, was die Entstehung und Ausbreitung der Entladungslawine begünstigt (28). Im Gegensatz zu Girke et al. (12), die der Auffassung sind, daß die limbischen Strukturen im Gehirn nur mäßig beeinflußt werden, sind Blum u. a. (4) zu dem Ergebnis gekommen, daß sich auch subkortikale Strukturen, nämlich Teile des limbischen Systems und des Thalamus als besonders empfindlich erweisen. Dies spielt jedoch bei der Ratte keine

Rolle, da bei ihr das Cortexgewebe überwiegend dem limbischen Cortex zugeordnet wird und damit einen Teil des limbischen Systems dar - stellt (24).

Da Benzodiazepine schon früher als Phosphodiesterasehemmer in vitro beschrieben wurden (32, 36), für Clonazepam jedoch noch keine Daten vorliegen, schien es sinnvoll, darüber Untersuchungen anzustellen.

Weiss et al. (45) und Shimizu et al. (38) sind der Meinung, daß die beiden Enzyme, die an der Synthese und dem Abbau von cyclo - AMP beteiligt sind, wahrscheinlich auch an der Regulation der nervösen Aktivität im ZNS teilhaben. Dabei spielen einige Neurotransmitter, wie Noradrenalin und Histamin, sowie Adenosin, die die cyclo - AMP - Bildung stimulieren, eine wesentliche Rolle (39).

Als Gehirnstrukturen wurden der Cortex cerebri sowie das Mittelhirn und die Basalganglien deshalb gewählt, weil aufgezeigt wurde, daß bei verschiedenen Rattenstämmen in diesen Gebieten ein durch Noradrenalin hervorgerufener Anstieg von cyclo - AMP in Beziehung zu ihrer motorischen Aktivität steht. Der Unterschied in der Anhäufung von cyclo - AMP ist auffallend, aber gegenläufig in den untersuchten Gewebepräparaten. Bei Ratten mit gerin-

ger motorischer Aktivität traten nach Stimulierung mit Noradrenalin im Cortex hohe cyclo - AMP - Spiegel, im Mittelhirn hingegen niedrige cyclo - AMP - Spiegel auf. Die Tyrosinhydroxylase, ein entscheidendes Enzym bei der Biosynthese von Noradrenalin, verhält sich bei niedriger spontanmotorischer Aktivität gerade umgekehrt wie der cyclo - AMP - Spiegel, d. h. im Cortex ist die Enzymaktivität erniedrigt, im Mittelhirn erhöht (40). Die Beobachtung von Skolnick und Daly, daß bei geringer spontanmotorischer Aktivität im Cortex nach Stimulierung mit Noradrenalin hohe cyclo - AMP - Spiegel auftreten, hätte auch in den vorliegenden Experimenten erhöhte cyclo - AMP - Werte erwarten lassen. Dies war jedoch nicht der Fall. Bei den mit Clonazepam vorbehandelten Ratten war an keinem Tag nach Behandlungsbeginn ein signifikanter Anstieg nach Noradrenalin - Reizung zu verzeichnen. Dies kann ein Hinweis dafür sein, daß Clonazepam nicht als Phosphodiesterasehemmer wirkt, sondern die Wirkung über einen anderen, bis jetzt noch unbekannten Mechanismus läuft.

Welche Rolle Adenosin im Gehirn in Bezug auf die Adenylatcyclase spielt, ist noch weitgehend unbekannt. Der Effekt von Adenosin auf die cyclo - AMP - Bildung scheint recht komplex zu sein (33).

Für die Anwesenheit eines extrazellulären Adenosin-

rezeptors sprechen einige experimentelle Untersuchungen (17, 18, 34, 35).
Kürzlich wurde berichtet, daß Adenosin die Frequenz des postsynaptischen Potentials beträchtlich erniedrigt und gleichzeitig die cyclo - AMP - Bildung erhöht (23, 27). Diese Erhöhung des cyclo - AMP - Spiegels ruft ihrerseits wieder eine Verlängerung der Refraktärphase hervor, woraus eine geringere Entladungsfrequenz resultiert. Es wird deshalb angenommen, daß der Effekt von Adenosin auf die Adenylatcyclase als eine Art neuromodulatorische Substanz mit den pharmakologischen Effekten von Clonazepam, wie Sedierung und EEG - Verlangsamung, in Beziehung steht. Die Benzodiazepine haben die Eigenschaft, die normale hemmende synaptische Aktivität zu potenzieren und damit die neuronale Erregbarkeit herabzusetzen (37). Auch Blum beschreibt für Clonazepam die für die Benzodiazepine charakteristische Wirkung, nämlich daß sie die präsynaptische Hemmung verstärken und verlängern (4). Nach den vorliegenden Ergebnissen könnte man sich auch vorstellen, daß eine durch Adenosin verstärkte cyclo - AMP - Bildung, die eine verlängerte relative Refraktärphase in der Erregbarkeit der Neurone verursacht, die exzitatorische synaptische Aktivität herabsetzt.
In den Untersuchungsergebnissen zeigt sich nach

Stimulierung der Adenylatcyclase mit Adenosin am 3. und 6. Tag nach Vorbehandlung mit Clonazepam schon ein leichter cyclo - AMP - Anstieg, am 10. Tag jedoch erst ein signifikanter Anstieg im Cortexgewebe. Dieser ging am 15. Tag wieder zurück und war am 21. Tag nicht mehr zu erkennen.
Die erst am 10. Tag auftretende signifikante cyclo - AMP - Erhöhung auf Zusatz von Adenosin hin könnte so zu erklären sein, daß das Medikament erst nach einer gewissen Zeit seine volle Wirksamkeit entfaltet, d. h. möglicherweise die Phosphodiesterase stärker hemmt. Allerdings dürfte Clonazepam nicht unmittelbar als Phosphodiesterasehemmer wirken, da bei Stimulierung mit Noradrenalin kein signifikanter Effekt zu sehen ist, sondern wahrscheinlich über einen noch unbekannten Mechanismus, der in Verbindung mit der Wirkung von Adenosin stehen könnte. Die verstärkte Bildung von cyclo - AMP nach Stimulierung mit Adenosin am 10. Tag nach Beginn der Behandlung bewirkt möglicherweise eine Verlängerung der relativen Refraktärphase der Synapsen, die nun eine geringere Entladungsfrequenz aufweisen, d. h. es handelt sich um eine Hemmung der postsynaptischen Impulsfrequenz und damit möglicherweise zusammenhängend um eine verminderte motorische Aktivität. Eine verminderte motorische Aktivität bewirkt nun ihrerseits wieder, wie Skolnick beschreibt, eine Erhöhung der

cyclo - AMP - Spiegel. Daß bei längerer Behandlung aber nur noch ein geringer Anstieg über entsprechende Kontrollen zu verzeichnen ist, könnte in einem Gewöhnungseffekt von Clonazepam zu suchen sein, von dem auch Negrin berichtet (26).
Diese Beobachtung machte er an 60 Kindern mit epileptischen Anfällen, die er 4 bis 6 Monate mit Clonazepam behandelte. Die Gewöhnung trat bei ihnen durchschnittlich erst nach 20 bis 25 Tagen auf. Durch eine Dosiserhöhung und eine Intervalltherapie mit Nitrazepam konnte der Gewöhnungseffekt hinausgezögert werden (26).
Die beim Menschen später auftretende Gewöhnung liegt verglichen mit dem hier beschriebenen Befund vermutlich daran, daß Clonazepam im Menschen langsamer metabolisiert wird als in der Ratte.
Die Experimente mit Mittelhirngewebe zeigen bei den mit Clonazepam vorbehandelten Ratten bezogen auf die Gesamtkontrollen am Tag 3, Tag 10 und Tag 15 nach Stimulierung mit Noradrenalin nur eine geringe, statistisch nicht signifikante Erhöhung des cyclo - AMP - Spiegels. Nach Skolnick steigt bei hoher motorischer Aktivität nach Stimulierung mit Noradrenalin der cyclo - AMP - Spiegel im Mittelhirn der Ratte stark an, während bei niedriger motorischer Aktivität kein so ausgeprägter Anstieg der cyclo - AMP - Werte nach Noradrenalin - Stimulierung zu

beobachten ist (40).
Da die mit Clonazepam vorbehandelten Ratten eine geringere spontanmotorische Aktivität aufweisen, korreliert der nur unerhebliche cyclo - AMP - Anstieg in den vorliegenden Versuchsergebnissen mit den Beobachtungen von Skolnick. Bei den abschließenden Experimenten, bei denen mit nicht vorbehandelten Rattengehirnen gearbeitet wurde, ist Clonazepam und 7 - Acetamidoclonazepam in einer Konzentration, wie sie annähernd bei einer Behandlung in vivo im Gehirn zu erwarten wäre, zugegeben worden.
Hierzu liegen allerdings nur Untersuchungen für Diazepam vor (10). Aufgrund der chemischen Verwandtschaft kann man jedoch annehmen, daß sich keine beträchtlichen Unterschiede zwischen Diazepam und Clonazepam ergeben werden.
In vitro hatte Clonazepam (3 µg/ml) auf die Stimulierung der cyclo - AMP - Bildung durch Noradrenalin und Adenosin keinen signifikanten Einfluß. Diese Beobachtung kann ein Anhaltspunkt dafür sein, daß bei der sofort einsetzenden Wirkung von Clonazepam das cyclo - AMP - System nicht beteiligt ist.
Abschließend könnte man sagen, daß nach einer langdauernden Behandlung mit dem Antiepileptikum Clonazepam bei Ratten lediglich eine cyclo - AMP -

Erhöhung im Cortex nach Stimulierung mit Adenosin gefunden werden konnte. Bei Stimulierung mit Noradrenalin war bei den Versuchen kein Effekt zu sehen. Diese Tatsache könnte als Hinweis gelten, daß Clonazepam als Abkömmling der Benzodiazepine nicht direkt als Phosphodiesterasehemmer wirkt und damit zur cyclo - AMP - Erhöhung führt, sondern auf einem noch unbekannten Mechanismus in Verbindung mit Adenosin läuft.
Hierzu wären jedoch noch ergänzende Versuche nötig. Besonders interessant erscheint jedoch die Beobachtung, daß nach längerer Behandlungsdauer mit Clonazepam ein Gewöhnungseffekt auftritt. Somit kann Clonazepam, wie man anfänglich glaubte, nicht als Langzeittherapeutikum in der Epilepsiebehandlung herangezogen werden. Aus diesem Grund bringt es, auch wenn es in vielen Fällen zu Beginn der Therapie als Mittel der ersten Wahl verwendet wird, auf die Dauer gesehen keine entscheidenden Vorteile gegenüber anderen Antiepileptica.

Zusammenfassung

Männliche Sprague - Dawley - Ratten wurden bis zu 21 Tage mit einer täglichen Clonazepamdosis von 5 mg/kg Körpergewicht behandelt. Die Kontrollratten erhielten eine Gelatinelösung. Nach 1, 3, 6, 10, 15 und 21 Tagen Behandlung wurden 24 Stunden nach der letzten Applikation des Medikaments Tiere getötet. Das Gehirn wurde entnommen und Gehirnschnitte vom Cortex cerebri sowie vom Mittelhirn und den Basalganglien angefertigt. Durch Inkubation mit Noradrenalin und Adenosin wurde das cyclo - AMP - System in den Gehirnschnitten stimuliert. Dabei zeigte sich bei Noradrenalin im Cortexgewebe kein signifikanter Anstieg des cyclo - AMP - Spiegels gegenüber den mit Placebo behandelten Tieren. Im Mittelhirn war eine Erhöhung gegenüber den Kontrolltieren zu verzeichnen, die jedoch ebenfalls nicht signifikant war. Bei Stimulierung mit Adenosin war 10 Tage nach Behandlungsbeginn eine signifikante cyclo - AMP - Erhöhung im Cortexgewebe verglichen mit den Kontrolltieren zu verzeichnen. Danach trat ein starker Abfall des cyclo - AMP - Spiegels auf. Dies könnte auf einem Gewöhnungseffekt von Clonazepam beruhen.
In einer Versuchsreihe wurden Schnitte des Cortex cerebri mit Stimulatoren des Adenylatcyclasesystems,

wie Noradrenalin und Isoprenalin inkubiert. Zusätzlich wurde noch als Phosphodiesterasehemmer Diazepam allein und Diazepam jeweils in Verbindung mit Noradrenalin oder Isoprenalin für die Inkubation verwendet. Die Konzentration von Diazepam betrug 0,25 mMol/l. Bei den Kontrollratten fand sich nur bei der Inkubation mit Diazepam + Isoprenalin gegenüber Isoprenalin allein ein signifikant erhöhter cyclo - AMP - Wert. Bei den mit Clonazepam vorbehandelten Ratten traten bei Inkubation mit Diazepam allein und bei Inkubation mit Diazepam jeweils mit Noradrenalin und Isoprenalin signifikante cyclo - AMP - Erhöhungen gegenüber den Kontrollinkubationen auf.

In Experimenten, für die nicht vorbehandelte Ratten verwendet wurden, wurden Cortexschnitte mit Clonazepam und 7 - Acetamidoclonazepam jeweils in Anwesenheit von Noradrenalin und Adenosin inkubiert. Für Clonazepam und 7 - Acetamidoclonazepam wurde eine Konzentration von 3 µg/ml gewählt, wie sie annähernd bei einer Behandlung in vivo im Gehirn erreicht werden dürfte. Es kam zu leichten cyclo - AMP - Erhöhungen, für eine statistische Signifikanz reichten sie jedoch bei weitem nicht aus.

Die vorliegenden Untersuchungen ließen erkennen, daß ein Einfluß von Clonazepam auf die cyclo - AMP - Bildung in Rattengehirnen besteht. Es scheint jedoch

wahrscheinlich, daß die Beeinflussung des cyclo - AMP - Spiegels nicht über eine Phosphodiesterase-hemmung, sondern höchstens über einen noch ungeklärten Mechanismus mit Adenosin vermittelt wird, falls dies überhaupt eine Rolle spielt.

VII. Literaturverzeichnis

1. Beer, B., Chasin, M. Clody, D.E., Vogel, J.R., and Horovitz, Z.P.:
Cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase in brain: effect on anxiety.
Science 176, 428 - 430, (1972)

2. Beisenherz, G., Boltze, H.J., Bücher, Th., Czok, R., Garbarde, K.H., Meyer - Arendt, E. und Pfleiderer, G.Z.:
Diphosphofructose - Aldolase, Phosphoglyceraldehyd - Dehydrogenase, Milchsäure - Dehydrogenase, Glycerophosphat - Dehydrogenase und Pyruvat - Kinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang.
Z. Naturf. 8b, 555 - 577 (1953)

3. Berndt, S., and Schwabe, U.:
Effect of psychotropic drugs on phosphodiesterase and cyclic AMP levels in rat brain in vivo.
Brain Res. 63, 303 - 312 (1973)

4. Blum, J.E., Haefely, W. Jalfre, M. Polc, P. und Schärer, K.: Pharmakologie und Toxikologie des Antiepileptikums Clonazepam.

Arzneimittel - Forschung (Drug Res.)
23, 377 - 486 (1973)

5. Butcher, R.W.:
Cyclic 3',5' - AMP and the lipolytic effects of hormones on adipose tissue.
Pharm. Rev. 18, 237 - 241 (1966)

6. Butcher, R.W., and Sutherland, E.W.:
Adenosine 3',5' - phosphate in biological materials. I. Purification and properties of cyclic 3',5' - nucleotide phosphodiesterase and use of this enzyme to characterize adenosine 3',5' - phosphate in human urine.
J. Biol. Chem. 237, 1244 - 1250 (1962)

7. Castroviejo, P.I.:
Expérience sur 200 cas présentant divers genres d' épilepsie traités avec le Ro 5 - 4023.
Vortrag, XIII. Internationaler Kongreß für Pädiatrie, Wien, 29.8. - 4.9. 1971

8. Drummond, G.I., and Perrot - Yee, S.:
Enzymatic hydrolysis of adenosine 3',5'-phosphoric acid.
J. Biol. Chem. 236, 1125 - 1129 (1969)

9. Fennessy, M.R.,and Lee, J.R.:
The effect of benzodiazepines on brain amines of the mouse

Arch. int. Pharmacodyn. 197, 37 - 44 (1972)

10. Garattini, S., Mussini, E., Marcucci, F.,and Guaitani, A. in "The benzodiazepines" (Garattini, S., Mussini, E., and Randall, L.O. eds), Raven Press, New York, 1973

11. Gastaut, H.:
Propriétés anti - épileptiques exceptionelles d' une benzodiazépine nouvelle, le Ro 5 - 4023.
Vie méd. 51, 5175 - 5188 (1970)

12. Girke, W., Krebs, F. - A. und Lenzner, W.:
Resultate mit einem neuen Antikonvulsivum.
Aerztl. Prax. 25, 4518 - 4522 (1973)

13. Groh, Ch. und Rosenmayr, F.W.:
Orale Dauertherapie mit Clonazepam (Ro 5 - 4023) bei Epilepsien des Kindes- und Jugendalters.
Acta neurol. Scand. 49, 36 - 43 (1973)

14. Glowinski, J., and Iversen, L.L.:
Regional studies of catecholamines in the rat. I. The disposition of (3H)-norepinephrine, (3H) dopamine and (3H) dopa in various regions of the brain.
J. Neurochem. 13, 655 - 669 (1966)

15. Huang, M., Shimizu, H., and Daly, J.W.:
Regulation of adenosine cyclic 3',5'-phosphate formation in cerebral cortical slices. Interaction among norepinephrine, histamine, serotonine.
Mol. Pharmacol. 7, 155 - 162 (1971)

16. Huang, M., Shimizu, H., and Daly, J.W.:
Accumulation of cyclic adenosine monophosphate in incubated slices of brain tissue. Effects of depolarizing agents, membrane stabilizers, phosphodiesterase inhibitors, and adenosine analogs.
J. Med. Chem. 15, 462 - 466 (1972)

17. Huang, M., Gruenstein, E.,and Daly, J.W.:
Depolarization - evoked accumulation of cyclic AMP in brain slices: inhibition by exogenous adenosine deaminase.
Biochim. Biophys. Acta 329, 147 - 151 (1973)

18. Huang, M., and Daly, J.W.:
Adenosine - elicited accumulation of cyclic AMP in brain slices: potentiation by agents which inhibit uptake of adenosine.
Life Sci. 14, 489 - 503 (1974)

19. Kakiuchi, S., and Rall, T.W.:
The influence of chemical agents on

the accumulation of adenosine 3',5'-phosphate in slices of rabbit cerebellum.
Mol. Pharmacol. 4, 367 - 378 (1968)

20. Kakiuchi, S., Rall, T.W., and McIlwain, H.:
The effect of electrical stimulation upon the accumulation of adenosine 3',5'- phosphate in isolated cerebral tissue.
J. Neurochem. 16, 485 - 491 (1969)

21. Karlson, P.:
Kurzes Lehrbuch der Biochemie, 8. Auflage, Thieme - Verlag, Stuttgart, 1972

22. Ketz, E., Bernoulli, C. und Siegfried P.:
Klinische und hirnelektrische Prüfung von Clonazepam (Ro 5 - 4023) unter besonderer Berücksichtigung des Status epilepticus.
Acta neurol. Scand. 49, 47 - 53 (1973)

23. Kuroda, Y., and Kobayashi, K.:
Effects of adenosine and adenine nucleotides on the postsynaptic potential and on the formation of cyclic adenosine 3',5'- monophosphate from radioactive adenosine triphosphate in guinea pig olfactory cortex slices.
Proc. Japan Acad. 51, 495 - 500 (1975)

24. MacLean, P.D.:
The Limbic system and its hippocampal formation. Studies in animals and their possible application to man.
J. Neurosurg. 11, 29 - 41 (1954)

25. Martin, D.: Pädiatrische Erfahrungen mit Clonazepam (Ro 5 - 4023); in " Epilepsie" (Kruse, R., Herausgeber), Thieme - Verlag, Stuttgart, 1971

26. Negrin,P.: Ro 5 - 4023 - Therapie trotz beachtlicher Erfolge problematisch.
Med. Trib. Ausg. Deutschl. 7, 17 (1972)

27. Okada,Y., and Kuroda, Y.:
Inhibitory action of adenosine and adenine nucleotides on the postsynaptic potential of olfactory cortex slices of the guinea pig.
Proc. Japan Acad. 51, 491 - 494 (1975)

28. Petsche, H.: Zum Nachweis des kortikalen Angriffspunktes des antikonvulsiven Benzodiazepinderivates Clonazepam (Ro 5 - 4023).
Z. EEG - EMG 3, 145 - 153 (1972)

29. Rett, A.: Möglichkeiten und Grenzen der Clonazepam - Therapie im Kindesalter.
Wien. klin. Wschr. 83, 725 - 734 (1971)

30. Riley, G.A.: Action of adenosine 3',5' - phosphate in dog liver preparations.
Fed. Proc. 22, 258 abs 588 (1963)

31. Schultz, J.: Adenosine 3',5' - monophosphate in guinea pig cerebral cortical slices: effect of benzodiazepines.
J. Neurochem. 22, 685 - 690 (1974)

32. Schultz, J.: Cyclic adenosine 3',5' - monophosphate in guinea pig cerebral cortical slices: studies on the role of adenosine.
J. Neurochem. 24, 1237 - 1242 (1975)

33. Schultz, J., and Daly, J.W.:
Cyclic adenosine 3',5' - monophosphate in guinea pig cerebral cortical slices. I. Formation of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate from endogenous adenosine triphosphate and from radiactive adenosine triphosphate formed during a prior incubation with radioactive adenine.
J. Biol. Chem. 248, 843 - 852 (1973)

34. Schultz, J., and Daly, J.W.:
Cyclic adenosine 3',5' - monophosphate in guinea pig cerebral cortical slices. II. The role of phosphodiesterase activity in the regulation of levels of cyclic adenosine 3',5' - monophosphate.

J. Biol. Chem. 248, 853 - 859 (1973)

35. Schultz, J., and Hamprecht, B.:
Adenosine 3',5' - monophosphate in cultured neuroblastoma cells: effect of adenosine, phosphodiesterase inhibitors and benzodiazepines.
Naunyn - Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 278, 215 - 225 (1973)

36. Scollo - Lavizzari, G.:
Biochemische Aspekte und allgemeine Prinzipien der antikonvulsiven Therapie.
Praxis 39, 1207 - 1212 (1972)

37. Shimizu, H., Creveling, C.R., and Daly, J.W.:
Stimulated formation of adenosine 3',5'-cyclic phosphate in cerebral cortex: synergism between electrical activity and biogenic amines.
Proc. natn. Acad. Sci. U. S. A. 65, 1033 - 1040 (1970)

38. Shimizu, H., and Daly, J.W.:
Effect of depolarizing agents on accumulation of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in cerebral cortical slices.
Europ. J. Pharmacol. 17, 240 - 252 (1972)

39. Skolnick, P., and Daly, J.W.:
Norepinephrine - sensitive adenylate cyclase in rat brain: relation to behavior and tyrosine hydroxylase.
Science 184, 175 - 177 (1974)

40. Stein, L., Wise, C.D., and Bergen, B.D. in
" The benzodiazepines" (Garattini, S., Mussini, E., and Randall, L.O., eds.),
Raven Press, New York, 1973

41. Sutherland, E.W., and Rall, T.W.:
The relation of adenosine 3',5' - phosphate and phosphorylase to the actions of catecholamines and other hormones.
Pharm. Rev. 12, 265 - 299 (1960)

42. Sutherland, E.W., Rall, T.W., and Menon, T.:
Adenyl cyclase. I. Distribution preparation, and properties.
J. Biol. Chem. 237, 1220 - 1227 (1962)

43. Weinmann, H.-M. und Willms, E.:
Kurzer Erfahrungsbericht über die Wirksamkeit des Antikonvulsivums Ro 5 - 4023 (Clonazepam) auf verschiedene Epilepsieformen.
Acta neurol. Scand. 49, 124 - 132
(1973)

44. Weiss, B., and Kidman, A.D. in " Advances in
biochemical psychopharmacology"
(Greengard, P., and Costa, E., eds.)
Vol. 1, Raven Press, New York, 1969

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. J. Schultz für die Überlassung des Themas und fachkundige Beratung bei Durchführung und Auswertung der Versuche danken.
Mein besonderer Dank gilt Frl. Gertrud Kleefeld für die jederzeit hilfsbereite Unterstützung bei der Durchführung der Versuche.

L E B E N S L A U F

Am 7. April 1951 wurde ich, Elisabeth Nothelfer, geb. Zottmann, als Tochter des Ludwig Zottmann und seiner Ehefrau Liselotte, geb. Schlör in München geboren. Von 1957 - 1961 besuchte ich die Volksschule am Winthirplatz in München, von 1961 - 1970 das Städt. Louise - Schröder - Gymnasium, ebenso in München, wo ich auch das Abitur ablegte. Im Sommersemester 1971 begann ich mit dem Studium der Medizin an der Ludwig - Maximilians - Universität in München. 1972 legte ich dort das Vorphysikum ab. Im Wintersemester 1972/73 setzte ich mein Studium an der Eberhard - Karls - Universität in Tübingen fort, wo ich 1974 das Physikum ablegte. Am 7. Oktober 1977 bestand ich die ärztliche Prüfung vor dem Prüfungsausschuß in Tübingen.